

10 / 536903

T/JP03/15227

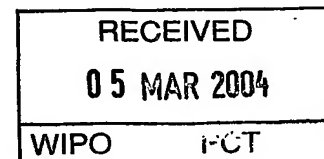
日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE31 MAY 2005  
13.1.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年11月29日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-348714  
[ST. 10/C]: [JP2002-348714]



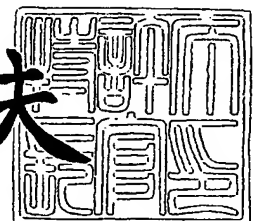
出 願 人  
Applicant(s): 財団法人化学及血清療法研究所

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特2004-3010748

【書類名】 特許願  
【整理番号】 JP425YS  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61K 38/04  
A61K 38/17  
C07K 7/04  
C07K 14/47

## 【発明者】

【住所又は居所】 熊本県熊本市麻生田 4 丁目 7 - 3 0 A 2 0 1

【氏名】 川村 亮一

## 【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡西合志町須屋 2 6 8 4 - 1 2

【氏名】 成瀬 毅志

## 【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡西合志町須屋 2 6 2 9 - 5

【氏名】 平嶋 正樹

## 【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡西合志町須屋 3 6 4 9 ガーデンコートみ  
ずき台 G 2 0 2

【氏名】 上仲 一義

## 【発明者】

【住所又は居所】 熊本県熊本市龍田町弓削 1 - 3 1 - 2

【氏名】 松田 純一

## 【発明者】

【住所又は居所】 熊本県熊本市壺川 1 丁目 2 - 1 1

【氏名】 前田 浩明

## 【発明者】

【住所又は居所】 福岡県福岡市西区生松台 1 - 2 1 - 2

【氏名】 野田 百美

## 【発明者】

【住所又は居所】 東京都小平市小川東町 4 - 1 - 1 I - 3 0 1

【氏名】 和田 圭司

## 【特許出願人】

【識別番号】 000173555

【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号

【氏名又は名称】 財団法人 化学及血清療法研究所

【代表者】 内野 矜自

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056568

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な神経伝達機能異常疾患改善剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 セレノシステイン含有タンパク質及び／または当該タンパク質を構成するセレノシステイン含有ペプチドもしくは当該ペプチドより構成されるペプチド群を主たる成分とする神経伝達機能異常疾患改善剤。

【請求項2】 前記セレノシステイン含有タンパク質がセレノプロテインPであるところの請求項1記載の神経伝達機能異常疾患改善剤。

【請求項3】 前記セレノシステイン含有ペプチドがセレノプロテインPのC末端側ペプチドである請求項1記載の神経伝達機能異常疾患改善剤。

【請求項4】 前記セレノプロテインPのC末端側ペプチドもしくは当該ペプチドより構成されるペプチド群がセレノプロテインPのC末端側260位アミノ酸から362位アミノ酸までのアミノ酸配列に由来し、それらのアミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記アミノ酸配列を含有するアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはペプチドまたは当該ペプチド群である請求項1から請求項3のいずれかに記載の神経伝達機能異常疾患改善剤。

【請求項5】 前記セレノプロテインPのC末端側ペプチドもしくは当該ペプチドより構成されるペプチド群が、次式、

(I) : Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys  
Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro  
Arg Ser Sec Cys Cys His Cys Arg His Leu  
及び／または

(II) : Thr Gly Ser Ala Ile Thr Sec Gln Cys  
Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu Cys Ser Sec  
Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile

(式中Alaはアラニン、Argはアルギニン、Asnはアスパラギン、Aspはアスパラギン酸、Cysはシステイン、Glnはグルタミン、Gluはグルタミン酸、Glyはグリシン、Hisはヒスチジン、Ileはイソロイシン、Ly

s はリジン、L e u はロイシン、M e t はメチオニン、P h e はフェニルアラニン、P r o はプロリン、S e r はセリン、T h r はトレオニン、T r p はトリプトファン、T y r はチロシン、V a l はバリン及びS e c はセレノシステインの各残基をそれぞれ表す) で表されるアミノ酸配列もしくは当該アミノ酸配列の部分配列を有し、うち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記アミノ酸配列を含有するアミノ酸配列を有するペプチドまたは当該ペプチド群である請求項4記載の神経伝達機能異常疾患改善剤。

【請求項6】 神経伝達機能異常疾患が、シナプス形成異常、アセチルコリンレセプター機能異常または一酸化窒素 (NO と称することがある) による神経作用異常に起因する疾患である、請求項1 から請求項5 のいずれかに記載の神経伝達機能異常疾患改善剤。

【請求項7】 神経伝達機能異常疾患が、重症筋無力症、スローチャネル症候群、先天性筋無力症、ランバート・イートン症候群、アルツハイマー病、痴呆症、脊髄小脳変性症、自律神経失調症、陰茎海綿体の勃起不全、脳血流不全、機能性胃腸症、及び緑内障より選択される請求項6記載の神経伝達機能異常疾患改善剤。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【産業上の利用分野】

本願発明は医療用医薬品の分野に属する血漿タンパク質の新たな用途に関する。さらに詳細には、神経伝達に関わる中枢及び末梢神経系に起因する神経並びに筋変性疾患に対する医薬品に関する。より詳しくは、血漿タンパク質の一種であるセレノプロテインPに例示されるセレノシステイン含有タンパク質を、好適には当該セレノプロテインPのC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群を主たる有効成分として含有する神経伝達機能異常疾患改善剤、とりわけシナプス伝達やアセチルコリンレセプター動作、一酸化窒素による神経細胞活性化に改善作用を有する薬剤に関する。

##### 【0002】

**【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】**

神経回路網において神経細胞と神経細胞間あるいは神経細胞と効果器細胞（例えば筋細胞）間の接合部をシナプスという。シナプスは神経回路網の情報伝達にとって重要な部位であり、通常、神経細胞の軸索末端部を情報の出力部（シナプス前部）とし、樹状突起、細胞体を情報の入力部（シナプス後部あるいは後膜）としている。神経末端に信号が伝わると、シナプス前部のシナプス小胞が開口分泌を起こし、内部に貯蔵されていた神経伝達物質がシナプス間隙に放出され、シナプス後膜に存在する神経伝達物質のレセプターに結合し、次の細胞に情報が伝えられる（例えば、非特許文献1参照）。

**【0003】**

神経伝達物質として、アセチルコリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、 $\gamma$ アミノ酪酸（GABA）、グリシン、セロトニン、ドパミン、ノルアドレナリン、アデノシン三リン酸（ATP）、各種の神経ペプチドなどが挙げられる。例えば、アセチルコリンは、生体内でコリンアセチルトランスフェラーゼによってコリンとアセチルCoAから合成され、シナプス小胞に貯蔵される。このようなアセチルコリンを放出する神経細胞をコリン動作性ニューロンと呼ぶ。中枢神経系では、前脳の基底部から大脳皮質や海馬への投射、脳幹部の橋脚部並びに外背側被蓋部から大脳皮質への投射の他、線条体内の介在ニューロンや前庭核から小脳への投射、または脊髄から下降性運動ニューロンもコリン動作性神経である。末梢神経系では、交感神経の1次神経、副交感神経の1次神経と2次神経、運動神経はいずれもその神経終末でアセチルコリンを分泌する（例えば、非特許文献1参照）。

一方、情報を受け取るシナプス後膜にあるアセチルコリンレセプターには大きくムスカリン性とニコチン性の2つのタイプが存在する。ムスカリン性は7回膜貫通型受容体ファミリーに属し、Gタンパク質を介してシグナルを細胞内に伝達する。ムスカリン性受容体はさらにホモロジーから5種類のサブタイプに分類され、Gタンパク質の種類によってフォスホリパーゼCを活性化するタイプ（M1, M3, M5）とアデニル酸シクラーゼを抑制するタイプ（M2, M4）の2種類に分類される。前者は細胞に対して興奮的に、後者は抑制的に作用する。これらのレセプターは脳全般以外に心臓や平滑筋や外分泌腺組織に広く分布する。ニコ

チン性受容体は、5つのサブユニットから構成されるイオンチャネルで、2つの $\alpha$ サブユニットと1つずつの $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\delta$ の5つから構成される。少なくとも $\alpha$ サブユニットには9種類、 $\beta$ サブユニットには4種類のサブタイプが知られている。ニコチン性受容体はその分布様式から、骨格筋型と神経型に分類されている（例えば、非特許文献1参照）。

#### 【0004】

アセチルコリン以外の神経伝達物質もそれぞれに対応したレセプターがあり、アセチルコリンレセプター同様、各々特有の神経組織分布を示している。これらの神経伝達物質がシナプス間隙で適正に授受されることによりレセプターを活性化し、さらにセカンドメッセンジャーを活性化し、神経細胞の生理学的反応を引き起こしている。レセプターによって、反応は興奮的（新たな活動電位の開始）に伝達されるか、抑制的（活動電位発生の抑制）になるか制御されており、これらが複雑に絡み合って、生体内の神経回路網は動いている（例えば、非特許文献1参照）。一方、一酸化窒素（NO）のようにレセプターははっきりしないが、例えば自律神経系の神経終末から放出され、効果器官の平滑筋の弛緩や脳の血流調節、陰茎海綿体の勃起などの作用を持つため神経伝達物質の一種であると考えられているものもある（例えば、非特許文献3参照）。NOの細胞間シグナル伝達物質としての作用は、受容体やトランスポーターを介さずに細胞膜を直接越えて拡散するため、作用範囲が広範に渡る。NOは、サイクリックGMP（cGMP）の合成酵素である可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化を誘導し、合成されたcGMPはcGMP依存性リン酸化酵素を活性化し、細胞内の生理作用を作用させ、細胞を活性化する（例えば、非特許文献6参照）。その一方で、NOはシナプス後部から放出され、シナプス前部終末からの神経伝達物質放出を調節する逆方向情報伝達物質としても作用するためシナプス可塑性の調節因子と考えられている（例えば、非特許文献6参照）。

#### 【0005】

このような神経伝達物質の関わる神経伝達に異常が生じると、様々な疾患を引き起こすことになる。例えば、アセチルコリンによる情報伝達システムは記憶学習の機能、自律神経、運動神経、交感及び副交感神経機能に関わっており（例え

ば、非特許文献1参照)、アセチルコリンによる情報伝達に異常が生じると、これらの機能に障害が生じ、様々な疾病の原因となる。神経伝達の欠陥に伴う疾患として、様々な病気が知られている。例えば、神経伝達物質の不均衡による疾患として、アルツハイマー病、不安、自閉症、脳障害、うつ病、ハンチントン病、躁病、疼痛、パーキンソン病など。神経伝達物質のレセプターに欠陥がある疾患として、重症筋無力症、スローチャネル症候群、先天性筋無力症など。神経伝達物質の神経細胞取り込み低下による疾患として、筋萎縮性側索硬化症など。イオンチャネルに欠陥があり神経伝達が正常にできない疾患として、発作性運動失調、高カリウム血性周期性四肢麻痺、低カリウム血性周期性四肢麻痺、ランバート・イートン症候群、先天性パラミオトニア、ラスムッセン脳炎、脊髄小脳変性症など。中毒疾患として、ボツリヌス中毒、蛇毒による中毒など、が知られている(例えば、非特許文献2及び非特許文献5参照)。

この他、自律神経系での神経伝達障害を改善し、病態を改善する薬剤が開発されている。例えば、眼圧低下を目的とした緑内障の治療薬として、アセチルコリンアナログであるピロカルピンやカルバコールが知られている(例えば、非特許文献4参照)。唾液腺のムスカリン受容体を刺激し、唾液分泌を促進する薬剤や、アセチルコリン遊離促進作用を持った消化管運動賦活剤が機能性胃腸症の治療薬として開発されている(例えば、非特許文献8参照)。

#### 【0006】

これらの疾患に対する薬剤は、神経伝達物質、そのアゴニスト、アンタゴニストあるいは抗コリンエステラーゼのように神経伝達物質の酵素分解や再吸収を阻害し、その半減期を延長させるものが大部分で、いずれも神経伝達物質とレセプターの直接的な反応をターゲットにしているものが多い(例えば、非特許文献9参照)。しかし、神経伝達物質とそのレセプターは前述のように種類が多く、その作用も興奮性、抑制性など多彩である。そのため思わぬ副作用が起こることがある。例えば、抗コリンエステラーゼ剤の過剰投与によるコリン動作性クリーゼ(急激な筋肉の麻痺症状)が生じたり、長期間投与でレセプターの変性が促進され、病態を悪化させたりすることがある(例えば、非特許文献7参照)。また、神経伝達は自律神経系に深く関わっているので危険な心肺機能低下が起こる可能



性も否定できない。これらの副作用を解決するために、これまでの薬剤とは異なる作用メカニズムを持ち、副作用の少ない安全な薬剤が求められている。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

上述の状況の下、本願発明者等は先に、血液成分由来のタンパク質で、セレノシステイン含有タンパク質の一種であるセレノプロテインP（以下、SePと称することがある）に、そしてより好適な態様として当該セレノプロテインPのC末端側ペプチドに、従来報告されていなかった細胞死抑制活性が認められることを見出し、この知見を基に特許出願した（例えば、特許文献1参照）。さらに、本願発明者は、新たな神経伝達機能異常疾患改善剤、とりわけ、シナプス伝達やアセチルコリンレセプター動作、一酸化窒素による神経伝達に改善作用を有する薬剤を供するべく鋭意研究した結果、驚くべきことに従来試みられることのなかった前記セレノプロテインPまたはそのC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群が、細胞死抑制活性のみならず、神経細胞を用いた培養実験や、モデル動物での実際の生体内投与によって、神経伝達機能を改善する作用を持つことを見出し、この知見に基づいて本願発明を完成するに至った。

#### 【0008】

セレノプロテインPは1977年にグルタチオンペロキシダーゼ（glutathione-peroxidase）とは異なるセレン含有タンパク質として確認され、1982年にセレンがセレノシステイン（Selenocystein）の形態で取り込まれていることが明らかにされた。さらに、1991年にラットセレノプロテインPのcDNAのクローニングにより全長のアミノ酸配列が明らかにされ、その結果、当該タンパク質は最大10個のセレノシステインを含む可能性等が示された（例えば、非特許文献10参照）。

1993年にはヒトセレノプロテインPの核酸塩基配列及びアミノ酸配列が報告された（例えば、非特許文献11参照）。セレノプロテインPの機能はほとんど不明であったが、最近、*in vitro*の系でphospholipid hydroperoxideの還元活性（例えば、非特許文献12参照）やperoxynitriteの消去活性（例えば、非特許文献13参照）があるとの報

告がなされた。また、Se 欠乏時に脳に特異的に Se を運搬するとの報告（非特許文献 14 参照）や、神経細胞の survival promoting factor としての作用（非特許文献 15 参照）が見出され、神経細胞の生存と関連が示唆されていた。しかし、この 2 つの報告からセレノプロテイン P の神経細胞生存維持活性以外の神経細胞に対する具体的な作用を類推することは難しく、ましてや、本願発明で述べるようなセレノプロテイン P の神経細胞活性化や神経伝達機能に関わるような作用を見出した例もない。

【0009】

【非特許文献 1】

「脳神経科学イラストレイテッド」森ら編集、羊土社

【非特許文献 2】

「Web版メルクマニュアル第 17 版日本語版」<http://www.merckmanual.l.banyu.co.jp/>

【非特許文献 3】

「標準生理学第 5 版」本郷ら監修、医学書院

【非特許文献 4】

「医学大辞典」CD-ROM 版、南山堂

【非特許文献 5】

「脳・神経研究の進めかた」真鍋ら編集、羊土社

【非特許文献 6】

「NO の生理作用と疾患」谷口ら編集、羊土社

【非特許文献 7】

「重症筋無力症」<http://www.nanbyou/tokuteisikkan/s/si7.html>

【非特許文献 8】

New Current, 26, 13, 2002

【非特許文献 9】

New Current, 2, 7, 1996

【非特許文献 10】

Hill K.E. and Burk R.F., Biomed Envi

r o n S c i . , 10, p.198-208, 1997

【非特許文献11】

K.E.Hillら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 537, 1993

【非特許文献12】

Y. Saitoら, J. Biol. Chem. 274, 2866, 1999

【非特許文献13】

G. E. Arteel ら, Biol. Chem., 379, 1201, 1998

【非特許文献14】

R. F. Burk ら., Am. J. Physiol., 261, E26-E30, 1991

【非特許文献15】

J. Yan and J. N. Barrett, J. Neurosci., 18, 8682, 1998

【特許文献1】

特願PCT/J P 99/06322

【0010】

本願発明者らは、具体的な事例として、神経様細胞であるNG108-15細胞を神経細胞に分化させる際にセレノプロテインPを培地に添加すると、神経突起進展の複雑さや結節状構造 (varicosity) が増強され、シナプス形成を促進することを見出した。また、ムスカリンアゴニストであるピロカルピンを用いたてんかん誘導のモデルマウスで、セレノプロテインPがてんかん症状を増強し、アセチルコリンレセプターの作用を増強することを見出した。さらに、マウス初代神経細胞を用いた培養で細胞に影響のでない濃度の一酸化窒素を発生させた際にセレノプロテインPを添加しておくと、神経細胞のミトコンドリア機能が亢進し、細胞が活性化されることを見出した。これらのことから、シナプス形成やアセチルコリンレセプター機能やNOによる神経細胞活性化の亢進、すなわち神経細胞の関わる神経伝達機能を改善する作用をセレノプロテインPが有していることが示された。

【0011】

本願発明は、セレノプロテインPの前記知見に基づく新たな薬効に関するものであり、本願発明の神経伝達機能異常疾患改善剤の本態はセレノプロテインPで

ある。さらに詳細には、セレノプロテインPの中のセレンを含むセレノシステインに特徴があり、このアミノ酸が神経伝達とりわけシナプス伝達やアセチルコリンレセプター動作、一酸化窒素による神経伝達の改善作用の中心的アミノ酸である。本願発明者等は、先の特許出願において、血液成分由来のタンパク質であるセレノプロテインPのC末端側ペプチド断片に從來報告されていなかった細胞死抑制活性が認められること、その活性にはセレノシステインが関与していることを開示した。本願発明で述べる活性にも、含有されるセレノシステインが関与していることが明らかである。従って、セレノシステインを含み細胞死抑制活性を持つタンパク質及び／またはペプチド群は、神経伝達機能異常疾患改善剤の候補となりうる。

#### 【0012】

そもそも、本願発明に係るセレンは、微量必須元素の一つであり、それが欠乏した場合には心筋症などを伴う重篤な欠乏症が知られている。また、無血清培養の培地に亜セレン酸ナトリウムの添加が必須であることから、セレンが細胞レベルでの生存維持・増殖に必須であることが示されている。しかし、セレン化合物が毒物指定されていることから理解されるように、有効量と危険量の幅、つまり安全域の濃度幅が狭く、適量以上のセレン化合物は一般的には細胞にとって毒性を示し、逆に細胞死を誘導する。例えば、セレンの急性中毒症状として、顔面蒼白、神経症状、神経障害、皮膚炎、胃腸障害などが知られている。また、細胞培養にセレノシステインの2量体であるセレノシスチンを添加すると、単独ではかなり強い毒性を示す。これに対して、本願発明の好適な態様であるセレノプロテインP、セレノプロテインPのC末端側断片は、その構造中に9～10個のセレノシステインを含むにも拘わらず、強い毒性は観察されなかった。もともとセレノプロテインPは血液中に存在し、生体内を循環していると考えられることから、医薬品としての安全性は高いと考えられる。このことから、本発明の薬効作用を示すセレノプロテインPの特徴として、セレノシステインを含み、なおかつ毒性が減弱していることが重要と思われる。

本願発明のペプチドまたは当該ペプチド群は、毒性の低減というセレン化合物に対する命題を克服するのみならず、予期し得ない神経伝達改善作用をもたらす

ことを可能とするものである。

### 【0013】

ここで用いられるセレノシステイン含有タンパク質に特段の制約はなく、セレノシステインを含み所望の神経伝達改善活性を有するものであれば如何なる分子形態のものをも包含する。すなわち、完全分子型セレノプロテインP（配列番号1）をはじめ種々の分子形態のものが対象となり得る。この中で、好適な態様はセレノプロテインPのC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群であり、中でもC末端側103個（配列番号2：セレノプロテインP配列260位から362位まで、260KRCINQLLCKLPTDSELAPRSUCCHCRHLIF EKTGSAITUQCKENLP SLCSUQGLRAEENITESCQURLPAAUQISQQLIPTASASURUKNQAkkUEUPSN 362）のアミノ酸配列または当該アミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または、前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記アミノ酸配列を含有するアミノ酸配列を有するペプチドまたは当該ペプチド群は、とりわけ好適な態様として推奨され得る。

### 【0014】

なお、本願明細書で用いる「当該ペプチド群」とは、セレノシステインを含むペプチドで所望の神経伝達改善活性を有するものであればいかなる配列のペプチドの集合体でもよいが、好適には、セレノプロテインPのアミノ酸配列に由来し、少なくとも1個のセレノシステインを含むペプチドで、当該アミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、糖鎖の有無、荷電の相違、断片化の多様性等に起因する微細構造の異なるペプチドの集合体を意味する。すなわち、本願発明のセレノプロテインP及びペプチド群は、セレノシステイン含有タンパク質、とりわけセレノプロテインPのアミノ酸配列に由来し、細胞障害抑制活性を有するものであればその分子形態に特段の制約はなく、これらには完全分子型のセレノプロテインPをはじめこれに起因するC末端側ペプチド等が含まれる。このような本願発明のペプチドは、ペプチド合成機を用いて常法に従って調製することもできるし、また、本願発明のペプチドをリード物質として、化学合成物をデザインすることも可能である。

## 【0015】

本願発明に使用されるセレノプロテインPまたは当該タンパク質に由来するペプチドもしくはペプチド群を製造する方法は特に限定されるものではないが、例えばヒト血液より分離する方法、または遺伝子組換え技術により製造することができる。本願発明に使用される神経伝達機能異常疾患改善剤の主要構成成分となるセレノプロテインPまたは当該タンパク質に由来するペプチドもしくはペプチド群は、一般的な酵素類よりも熱、変性剤、幅広いpH、血中のプロテアーゼに対して安定であるため、これを精製固定するに際しては、一つの態様として、血漿を出発原料とし種々のクロマトグラフィー工程、例えば、ヘパリンクロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、抗体カラムの様な各種アフィニティークロマトグラフィー等、適用可能な種々の担体を用いた分画方法の他、硫酸アンモニウム沈殿分画、分子量膜分画、等電点分画、電気泳動分画等、種々の分画法が利用可能である。これらの分画法を組み合わせることにより、所望のセレノプロテインPまたはペプチドもしくはペプチド群を分画することが可能である。その望ましい組み合わせの一例を調製例1及び2に示す。

## 【0016】

本願発明では、有効成分としての当該タンパク質またはペプチドもしくはペプチド群と公知の適当な賦形剤を組み合わせ、公知の方法で本願発明の神経伝達機能異常疾患改善剤とすることができる。本願発明の神経伝達機能異常疾患改善剤の有効投与量は、投与対象者の年齢、症状及び重症度などにより変動し、最終的には医師の意図により変動する。薬効は投与方法には依存しないが、皮下、皮内、腹腔への投与、血管内への単回（ボラス）投与あるいは点滴投与などが最適である。また、分子量の小さなペプチド群の場合は、経口投与や経皮投与なども可能である。

## 【0017】

本願発明の神経伝達機能異常疾患改善剤の投与対象は、神経細胞と神経細胞、あるいは神経細胞と筋などの効果器官細胞との情報伝達異常や欠陥に起因し、神

経・精神症状や運動失調症状、自律神経失調症状などを呈する疾患であれば特に限定されることはない。例えば、神経伝達機能異常疾患として、シナプス形成異常、アセチルコリンレセプター機能異常、NOによる神経作用異常に起因する疾患が挙げられる。具体的には、アルツハイマー病、不安、自閉症、脳障害、うつ病、ハンチントン病、躁病、疼痛、パーキンソン病、重症筋無力症、スローチャネル症候群、先天性筋無力症、筋萎縮性側索硬化症、発作性運動失調、高カリウム血性周期性四肢麻痺、低カリウム血性周期性四肢麻痺、ランバート・イートン症候群、先天性パラミオトニア、ラスムッセン脳炎、脊髄小脳変性症、ボツリヌス中毒、蛇毒による中毒などが挙げられる。さらには、緑内障、唾液分泌促進が必要な疾患や、消化管運動賦活が必要な機能性胃腸症などが挙げられる。老化に付随する痴呆症、運動機能障害などもその対象として考慮され得る。神経伝達機能異常疾患改善剤として本願発明のセレノプロテインPまたはこれに由来するペプチドもしくはペプチド群を主要構成成分として含有する薬剤を使用する場合、本薬剤を単独で投与することもできるし、他の治療薬剤との併用投与も効果を増大させるための有効な手段として期待できる。また、予防的または治療的投与のいずれにおいても効果が期待できる。

#### 【0018】

##### 【発明の効果】

本願発明により、神経伝達機能に異常を呈している疾患に対する好適な神経伝達機能異常疾患改善剤、とりわけシナプス伝達改善剤、アセチルコリンレセプター動作改善剤、NOによる神経作用の改善剤が提供される。

#### 【0019】

以下、調製例及び実施例に沿って本願発明をさらに詳細に説明するが、これらは本願発明の範囲を何ら限定するものではない。なお、以下に示す調製例及び実施例では、特に断りのない限り、和光純薬、宝酒造、東洋紡及びNew England BioLabs社、アマシャムバイオサイエンス社、バイオラド社、シグマ社、ギブコBRL社製の試薬を使用した。また、本実施例で使用したセレノプロテインP及びその断片は調製例に示したものをを使用した。

#### 【0020】

## 【実施例】

## 調製例 1

(セレノプロテイン P 断片の精製)

血漿中のヘパリンセファロース結合画分を 2 M 硫酸アンモニウムにより沈殿させ、その沈殿画分に対して 5 倍以上の 20 mM Tris (pH 8.0) により沈殿を溶解させた。この溶液に存在するセレノプロテイン P を抗セレノプロテイン P 抗体カラムに結合させ、PBS で洗浄した。その後 4 M 尿素を含有する 20 mM クエン酸バッファー (pH 4.2) によりセレノプロテイン P を溶出し、20 mM クエン酸バッファー (pH 4.2) で平衡化した陽イオン交換体 (Macro prep High S:BioRad) に結合させた。これを塩化ナトリウムによる塩濃度勾配溶出を行ない、細胞死抑制活性を示す画分を回収した。この時、全長のセレノプロテイン P を得ることが可能であるが、蛋白あたりの細胞死抑制活性は明らかに弱い値を示した。本方法では、短時間の精製が可能であるため、蛋白あたりの細胞死抑制活性の強いセレノプロテイン P 断片を得ることができた。ここで得られた断片もまた、糖鎖の有無、分子間結合の有無、内部切断の有無などにより種々のサイズの分子種を含む混合画分であり、非還元電気泳動で 10-30 kDa のサイズを示すセレノプロテイン P 断片群であった。

## 【0021】

## 調製例 2

(セレノプロテイン P の精製)

ヒト血漿に対して、フルオロリン酸ジイソプロピル (和光純薬) 及びポリエチレングリコール 3000 (SIGMA) を、それぞれ終濃度 2 mM、5 % になるように添加、1 時間攪拌させ、10,000rpm で 15 分間遠心後、上清を回収した。その上清を PBS で平衡化した抗セレノプロテイン P 抗体カラムに結合させ、PBS で洗浄した。その後 4 M 尿素を含有する 20 mM クエン酸バッファー (pH 4~6) によりセレノプロテイン P を溶出し、20 mM クエン酸バッファーで平衡化した陽イオン交換体 (Macro prep High S:BioRad) に結合させた。これを塩化ナトリウムによる塩濃度勾配溶出を行ない、セレン含量の最も多い画分を回収した。この方法により還元電気泳動で 64 kDa の完全長セレ



ノプロテインPを血漿1リットルから2mg程度得ることができた。

### 【0022】

#### 実施例1

(シナプス形成促進作用)

セレノプロテインPのシナプス形成における効果を確認するために、神経様細胞であり、シナプス形成や受容体の研究で広く使用されているNG108-15細胞（マウス神経芽腫とラット・グリオーマの雑種細胞：ATCC NO. HB-12317）を用いて神経細胞への分化実験を行なった。ポルオルニチン・コーティングを施した35mmディッシュに、10%胎児牛血清、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を補ったDMEMを用いてNG108-15細胞をまき、37℃10%CO<sub>2</sub>にて培養した。1～2日後、HT（ヒポキサンチン、チミジン）を補った1%胎児牛血清DMEM（無血清培地）に培地交換し、0.1mMジブチルサイクリックAMP（dbcAMP）を加え、分化させた。この際、セレノプロテインPを4.36μg/ml培地に加え、3日間培養した。培養後、細胞がシートしたディッシュをリン酸バッファー生理食塩水（以下PBS）にて2回リンスし培養液を洗浄した。続いてPBSで4%濃度に調製したパラホルムアルデヒド液で細胞タンパクの固定化処理を行なった。室温にて30分間の固定化処理後、PBSにて2回リンスし固定液を除いた。続いて神経細胞のシナプスに特異的に発現しているタンパク質であるRab3aに反応する抗Rab3aマウスモノクローナル抗体（Synaptic Systems 社）をPBSにて濃度調製し、非特異タンパクのブロッキング処理のため10%ウシ血清アルブミン溶液を加えて、室温にて1時間反応させた（1次抗体反応）。抗体反応終了後、PBSにて3～4回リンスした後、蛍光プローブAlexa 594を架橋した抗マウスIgG抗体を室温にて1時間反応させた（2次抗体反応）。抗体反応終了後、PBSにて3～4回リンスした後、レーザー顕微鏡にて励起波長594nmにて赤色蛍光像を観察・デジタルカメラ撮影した。明視野撮影像と蛍光顕微鏡撮影像を同視野で撮影し、2枚の写真を合成して解析に用いた。

### 【0023】

これらの培養の結果、セレノプロテインを加えて3日間分化誘導した細胞では

、明らかに突起伸展が複雑であり、粒状のvaricosityが多かった。細胞体にも短い突起が多く見られた。一方、セレノプロテイン非存在下の細胞は概して丸く、長い突起を有する細胞もあるが、varicosityは少なかった。シナプス特異的な抗Rab3aマウスモノクローナル抗体で染色した結果、図1に示すように、明らかにセレノプロテインP添加群では神経突起上にRab3a染色された瘤状の粒が多く認められた。このRab3a抗体特異的に染色されたシナプスがどのくらいの割合で存在するかをマッキントッシュ用画像解析ソフトウェア「Mac SCOPE（三谷商事製）」を用いて免疫陽性のスポットを計測した。SeP添加群で4視野、SeP非添加群で3視野の撮影画像を任意に選び解析に使用した。撮影画像の神経細胞体部分を選択範囲から除外し、神経突起の部分のみを解析範囲とした。デジタル画像上では免疫陽性部分は三原色（RGB）レベルで赤（R）の値を高くもっているため解析ソフトウェアで赤の値をもっているスポットのみを抽出し、そのスポットの計測が可能である。同時に、免疫反応性が無いvaricosity個数を手動で計測し、最後に画像上の総varicosity数に占める免疫陽性のvaricosity数を割合（％）として計算した。その結果、表1に示すように、明らかにシナプス形成が促進されていることが示された。

【0024】

【表1】

	Rab3a 免疫陽性率±SD（％）
SeP 添加群	66.0 ± 2.75
SeP 非添加群	38.8 ± 18.3

【0025】

## 実施例2

(アセチルコリンレセプター機能亢進作用)

セレノプロテインPのコリン作動性神経細胞への効果を確認するために、神経細胞及び神経細胞と筋肉の接合部（シナプス終末）に存在するアセチルコリンレセプターに作動的に作用する薬剤であるピロカルピンをマウスに投与し、けいれんを誘発させる実験を行なった。ピロカルピンは副交感刺激作用をもち、マウス

に投与すると四肢の間代性けいれんから全身けいれんに至る。

9週齢の雄のICRマウス（体重30～43g、日本クレアより購入）12匹を2群（6匹／群）に分け供試した。ピロカルピン投与1時間前に生理食塩水で2.5mg/mLに濃度調製したセレノプロテインPを1匹あたり0.5mg相当量（液量200μL）投与し試験群とした。対照群には等量の生理食塩水を腹腔内投与した。ピロカルピン（ピロカルピン塩酸塩、和光純薬）を生理食塩水にて100mg/mLに調製後、270～320mg/kg相当量を腹腔内注射により投与し、投与直後よりデジタルビデオによる撮影を開始し、実験の記録を行なった。ピロカルピン投与後60分間の観察時間を設け、全身けいれん発作を発現するまでの時間及び生死を評価の基準とした。セレノプロテインPがピロカルピンの作用を増強すれば、発作までの時間が短く、てんかん症状亢進により死亡率も上昇することになる。

#### 【0026】

この実験の結果、表2に示すように、セレノプロテインP投与群では対照群に比べ全身けいれん発作を発現するまでの時間が有意に短く、セレノプロテインPをマウスに投与したことによるけいれん誘導作用の増長が確認された。

#### 【0027】

【表2】

	ピロカルピン投与後のけいれん発作までの時間±SD
SeP投与群	6分47秒 ± 40秒*
SeP非投与群	12分29秒 ± 300秒*

\*p < 0.05

#### 【0028】

同様に図2に示すように、両群の生存率についてもセレノプロテインP投与群では対照群に比べて生存率が明らかに低下している結果を確認した。この実験の結果、セレノプロテインPがピロカルピンによるムスカリン性アセチルコリンレセプターへの作用を増強させている可能性が示唆された。

#### 【0029】

## 実施例 3

(NOによる細胞活性化増強作用)

シナプス伝達物質としてのNOの神経作用にセレノプロテインPが及ぼす効果を確認するために、培養した初代神経細胞にセレノプロテインPの存在下において、NO発生剤であるS-ニトロソ-N-アセチル-DL-ペニシラミン (SNAP、同仁化学研究所製) を作用させ、セレノプロテインPの存在下において神経細胞のミトコンドリア呼吸能に変化が現れるか実験した。ミトコンドリア呼吸能の測定にはミトコンドリア内膜の脱水素酵素活性を簡易に測定するキット (Cell Counting kit-8、同仁化学研究所製) を用いた。

C57BL/6妊娠14日齢マウス (日本チャールズリバーより購入) から胎仔を摘出し、胎仔由来の脳皮質を0.25%トリプシンEDATにて分散処理後、B27サプリメントを添加したNeurobasal Medium (いずれもギブコBRL製) にて37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養し初代神経細胞の培養を行なった。培養には予めポリ-D-リジンを4 μg/cm<sup>2</sup>にてコーティングした48穴マルチウェルカルチャープレートを用い、2×10<sup>5</sup> cells/wellの密度で細胞を播き込んだ。培養液量は500 μL/wellにて培養し、2～3日に一度の頻度で半量を新鮮な培養液に交換し、11日間細胞を維持した。培養11日目に培養液を除き、Neurobasal Mediumのみの培養液に交換した。その際、SNAPを添加しない群とSNAPを50 μMの濃度で添加した群を設定し、それぞれの群に対し、セレノプロテインPと亜セレン酸ナトリウムをセレン濃度で1 μMになるように、またセレノプロテインP断片をセレン濃度で0.26 μMで添加した群を設定した。SNAP濃度の50 μMは神経細胞にダメージを与えない濃度として設定した。37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で15時間培養後、Cell Counting kit-8の反応液を培養液の1/10量添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で4時間反応させた。呈色反応後、96穴のマイクロプレートへ培養上清を100 μLずつ移し、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmの波長を参照波長650 nmにて測定した。

## 【0030】

この実験の結果、図3に示すように、セレノプロテインPを添加するだけで初

代神経細胞のミトコンドリア内膜の脱水素酵素（ミトコンドリア呼吸能）の活性が上昇傾向にあった。同じく、セレノプロテインP断片のみを添加した群では有意に初代神経細胞の細胞活性を上昇させた。NO発生剤であるSNAPの存在下では、セレノプロテインP及びセレノプロテインP断片いずれの添加によっても神経細胞のミトコンドリア呼吸能を有意に上昇させた。ところが、この作用は亜セレン酸ナトリウム添加群には確認されず、セレノプロテインPもしくはセレノプロテインP断片による特異的な作用と考えられる。初代神経細胞は増殖しない（細胞分裂しない）と考えられているので、この酵素活性の上昇は細胞数の増加によるものではなく、細胞内が活性化したためだと考えられる。このようにセレノプロテインP及びセレノプロテインP断片には、NOと協調して細胞内のミトコンドリア呼吸能、すなわち細胞活性を増強する作用があり、このような作用を通じて、生体内のシナプス伝達・神経回路網全体の活性化をもたらすものと考えられる。

【0031】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE

<120>Novel Remedies for Dyskinesia

&lt;130&gt;JP425YS

&lt;160&gt;5

&lt;210&gt;1

&lt;211&gt;362

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Human plasma

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;Sec represents selenocysteine

&lt;400&gt;1

Glu	Ser	Gln	Asp	Gln	Ser	Ser	Leu	Cys	Lys	Gln	Pro	Pro	Ala	Trp
1				5					10					15
Ser	Ile	Arg	Asp	Gln	Asp	Pro	Met	Leu	Asn	Ser	Asn	Gly	Ser	Val
16				20					25					30
Thr	Val	Val	Ala	Leu	Leu	Gln	Ala	Ser	Sec	Tyr	Leu	Cys	Ile	Ile
31				35					40					45
Glu	Ala	Ser	Lys	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	Val	Lys	Leu	Lys	Lys	Glu
46				50					55					60
Gly	Tyr	Ser	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ile	Val	Val	Asn	His	Gln	Gly	Ile
61				65					70					75
Ser	Ser	Arg	Leu	Lys	Tyr	Thr	His	Leu	Lys	Asn	Lys	Val	Ser	Glu
76				80					85					90
His	Ile	Pro	Val	Tyr	Gln	Gln	Glu	Glu	Asn	Gln	Thr	Asp	Val	Trp
91				95					100					105
Thr	Leu	Leu	Asn	Gly	Ser	Lys	Asp	Asp	Phe	Leu	Ile	Tyr	Asp	Arg
106				110					115					120
Cys	Gly	Arg	Leu	Val	Tyr	His	Leu	Gly	Leu	Pro	Phe	Ser	Phe	Leu
121				125					130					135
Thr	Phe	Pro	Tyr	Val	Glu	Glu	Ala	Ile	Lys	Ile	Ala	Tyr	Cys	Glu

136	140	145	150
Lys Lys Cys Gly Asn Cys Ser Leu Thr Thr Leu Lys Asp Glu Asp			
151	155	160	165
Phe Cys Lys Arg Val Ser Leu Ala Thr Val Asp Lys Thr Val Glu			
166	170	175	180
Thr Pro Ser Pro His Tyr His His Glu His His His Asn His Gly			
181	185	190	195
His Gln His Leu Gly Ser Ser Glu Leu Ser Glu Asn Gln Gln Pro			
196	200	205	210
Gly Ala Pro Asn Ala Pro Thr His Pro Ala Pro Pro Gly Leu His			
211	215	220	225
His His His Lys His Lys Gly Gln His Arg Gln Gly His Pro Glu			
226	230	235	240
Asn Arg Asp Met Pro Ala Ser Glu Asp Leu Gln Asp Leu Gln Lys			
241	245	250	255
Lys Leu Cys Arg Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu			
256	260	265	270
Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser Sec Cys Cys His Cys			
271	275	280	285
Arg His Leu Ile Phe Glu Lys Thr Gly Ser Ala Ile Thr Sec Gln			
286	290	295	300
Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu Cys Ser Sec Gln Gly Leu Arg			
301	305	310	315
Ala Glu Glu Asn Ile Thr Glu Ser Cys Gln Sec Arg Leu Pro Pro			
316	320	325	330
Ala Ala Sec Gln Ile Ser Gln Gln Leu Ile Pro Thr Glu Ala Ser			
331	335	340	345
Ala Ser Sec Arg Sec Lys Asn Gln Ala Lys Lys Sec Glu Sec Pro			
346	350	355	360

Ser Asn

361

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt;103

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Human plasma

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sec represents selenocysteine

&lt;400&gt;1

Lys	Arg	Cys	Ile	Asn	Gln	Leu	Leu	Cys	Lys	Leu	Pro	Thr	Asp	Ser
1			5					10					15	
Glu	Leu	Ala	Pro	Arg	Ser	Sec	Cys	Cys	His	Cys	Arg	His	Leu	Ile
16			20					25					30	
Phe	Glu	Lys	Thr	Gly	Ser	Ala	Ile	Thr	Sec	Gln	Cys	Lys	Glu	Asn
31			35					40					45	
Leu	Pro	Ser	Leu	Cys	Ser	Sec	Gln	Gly	Leu	Arg	Ala	Glu	Glu	Asn
46			50					55					60	
Ile	Thr	Glu	Ser	Cys	Gln	Sec	Arg	Leu	Pro	Pro	Ala	Ala	Sec	Gln
61			65					70					75	
Ile	Ser	Gln	Gln	Leu	Ile	Pro	Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ser	Sec	Arg
76			80					85					90	
Sec	Lys	Asn	Gln	Ala	Lys	Lys	Sec	Glu	Sec	Pro	Ser	Asn		
91			95					100						

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt;33

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Human plasma



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sec represents selenocysteine

&lt;400&gt;2

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser  
1                      5                      10                      15

Glu Leu Ala Pro Arg Ser Sec Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile  
16                      20                      25                      30

Phe Glu Lys

31

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;29

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Human plasma

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sec represents selenocysteine

&lt;400&gt;3

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser  
1                      5                      10                      15

Glu Leu Ala Pro Arg Ser Sec Cys Cys His Cys Arg His Leu  
16                      20                      25

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt;28

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Human plasma

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sec represents selenocysteine

&lt;400&gt;4

Thr Gly Ser Ala Ile Thr Sec Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser

1 5 10 15

Leu Cys Ser Sec Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile

16 20 25

**【図面の簡単な説明】**

【図1】 セレノプロテインPによるシナプス形成促進作用を示す。分化3日後のLab3抗体染色/透過光同時撮影、Lab3抗体染色されたところは白く光っている。

【図2】 ピロカルピンチャレンジ後の生存率を示す。

【図3】 セレノプロテインP及びセレノプロテインP断片と一酸化窒素と

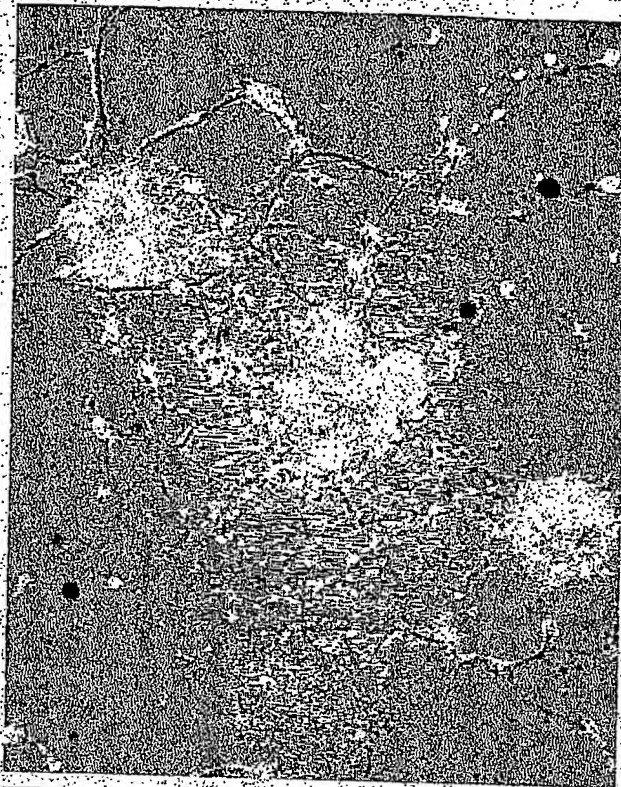
の協調による細胞活性化作用を示す。

【書類名】

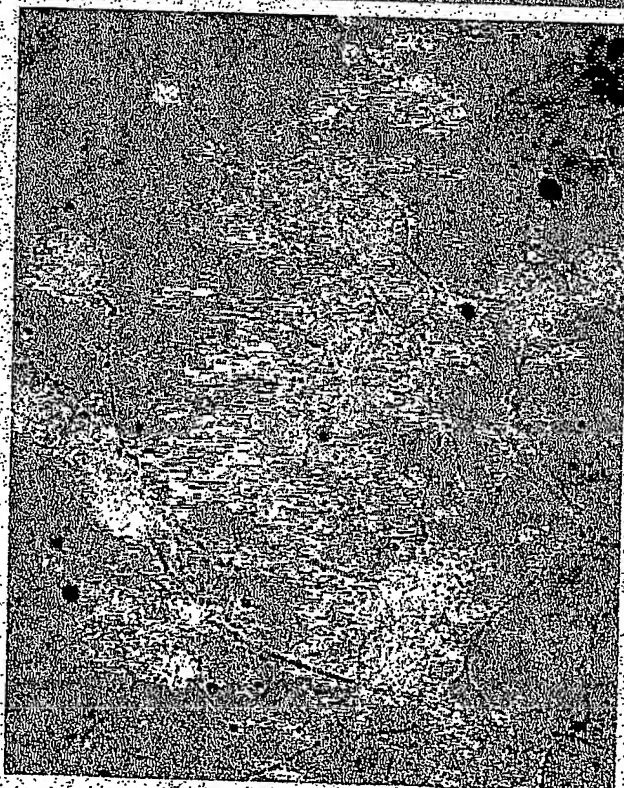
図面

【図 1】

SeP(4.36 $\mu$ g/mL)存在下



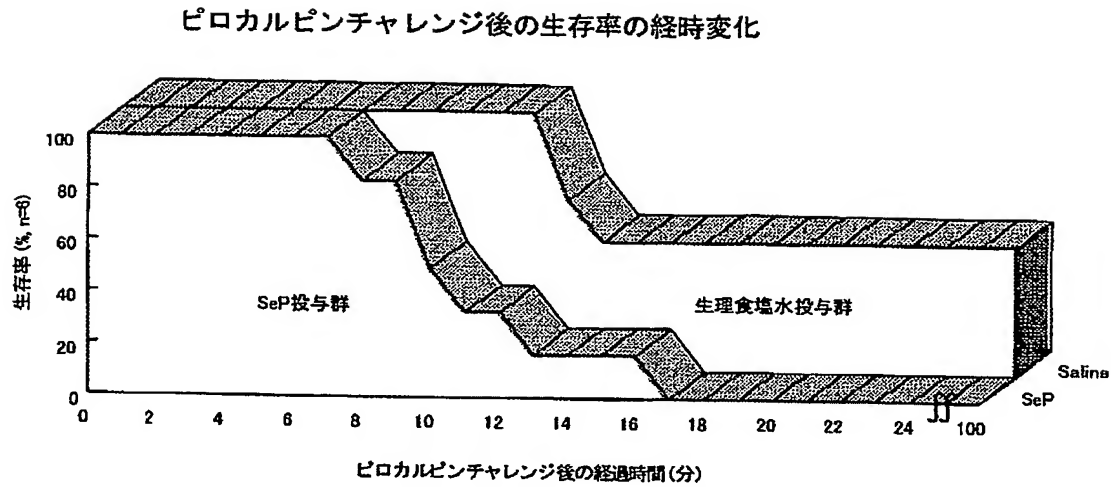
SeP非存在下



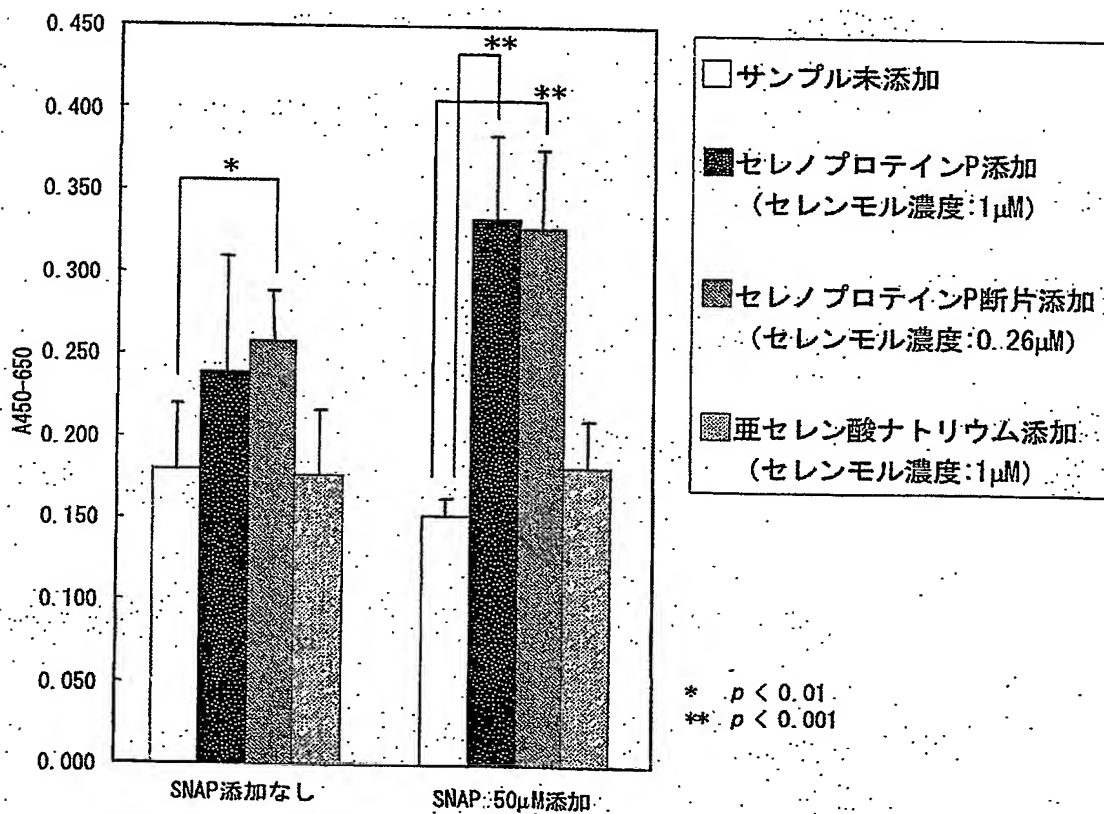
BEST AVAILABLE COPY

出証特 2004-3010748

【図 2】



【図 3】



【書類名】

要約書

【要約】

【目的】 新規な神経伝達機能異常疾患改善剤を提供する。

【構成】 好適にはセレノプロテインPで例示されるセレノシステイン含有タンパク質または当該タンパク質のC末端ペプチドもしくは当該ペプチド群を主要有効成分とする神経伝達機能異常疾患改善剤。

【効果】 種々の病因に起因する神経伝達機能異常疾患に対する好適な改善剤が提供される。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-348714
受付番号	50201816079
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年12月 2日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年11月29日

次頁無

出願人履歴情報

識別番号

[000173555]

1. 変更年月日

1996年 3月 4日

[変更理由]

住所変更

住 所

熊本県熊本市大窪一丁目6番1号

氏 名

財団法人化学及血清療法研究所